

ファイトケミカルスの機能発現に関するモデル検討(1)

福味 廣 員¹・砂川 武 義²・原 道 寛¹・吉村 喜 信¹・廣田 晃 一³

Model study on the function exertion of phyto chemicals (1)

H.Fukumi¹, T.Sunagawa², M.Hara¹, Y.Yoshimura¹, K.Hirota³

A part of the mechanism of functional exertion of isothiocyanates as phyto-chemicals, which are contained in cruciferous vegetables, was studied by means of CHACHE system. The LUMO (the lowest unoccupied molecular orbital) of several isothiocyanates and the HOMO (the highest occupied molecular orbital) of the reaction sites of these compounds in human Keap 1 protein (Kelch-like ECH-associated protein 1) were calculated. The reactivity of the isothiocyanates and cysteine regions of Keap 1 protein was discussed.

はじめに

植物性食品の健康増進機能については世界的に活発に研究が進められている¹。この中でもアブラナ科野菜類の抗腫瘍性²は、その機構も含めて深く研究されていて、それは次のようであるとされている^{3,4,5,6,7,8}。すなわち、ヒトの抗腫瘍機構の一つに解毒酵素（以下、**phase II** 酵素と記載）を誘導発現せしめてがん化を防止するというものがある。この **phase II** 酵素の産生には、転写因子 Nrf 2 (NF-E2-related factor 2) がトリガーとして作用して、該酵素産生遺伝子 ARE (Antioxidant response element) を活性化させるが、Nrf 2 は通常は酸化ストレス センサー蛋白である Keap 1 蛋白質 (Kelch-like ECH associated protein 1) と結合した不活性な状態で細胞質中に捕捉されている。ここに、例えばブロッコリー スプラウトから摂取されたイソチオシアネート化合物であるスルホラファンが入ってくると、このものは Keap 1-Nrf 2 複合体に作用し Nrf 2 を遊離せしめ、このものは細胞核内に移行、蓄積され、前記の転写因子として ARE に作用し **phase II** 酵素の産生が始るとされている。これらアブラナ科野菜類のイソチオシアネート化合物の該複合体への作用方式は直接作用するとされていて、その部位は Keap 1 蛋白質のセントラル リンカー領域を主体として位置する数個のシステインで、それらの SH 基にチオアルデヒドを作ることから Nrf 2 の遊離が始るとされている。これらの作用方式やその部位などについては、X 線結晶解析、タンデム マス分析、示差熱熱量分析、各種の合成イソチオシアネート化合物や遺伝子組み換え Keap 1 蛋白質とのモデル反応など多彩な手段を用いてその全貌の解明が試みられているが、その結合部位は Keap 1 蛋白質の N-末端から 151 番目に存在

1 福井工業大学工学部環境・生命未来工学科 2 同原子力技術工学科

3 (独) 国立健康・栄養研究所情報センター

するシステイン、C151、273 番目の C273、288 番目の C288 をはじめ、C297、C257、C319 などであって、これらの部位へのイソチオシアネートの形成⁹が起これば前記の機構に従って phase II 酵素が形成されるとするものや^{8,9,10,11,12}、ヒトの場合はこれだけでは不十分であるとするものもある¹³。このようにイソチオシアネート化合物と Keap 1 蛋白質の結合位置の関係は興味深いものである。一方、アブラナ科野菜にはその種類によって表-1 に示すように幾つかの物質が存在するので、これらの物質は全て同じように作用するのか、または作用部位が異なるのか、イソチオシアネート化合物を受け入れる各システイン間には反応性の違いは存在するのか、それらはどの程度のものかなどについて、本研究ではまず C151、C273、C288 を取り上げて、CAGe システムによるこれら物質、結合部位の LUMO、HOMO 電子軌道分布計算を基に、モデル検討を試み、興味ある結果を得たので報告する。福井地方では伝統野菜として、古くから、ま菜、四月菜、勝山水菜、和芥子など幾種かのアブラナ科野菜が栽培されている。

研究方法

電子軌道計算;CAGeシステム(version 3.22 for Windows, Fujitsu 社製)を用いて各分子の HOMO, LUMO 電子軌道を計算した。

計算対象分子;イソチオシアネート化合物は表-1 に記したのものについて上記方法で LUMO の値を計算した。Keap-1 の C151、C273、C288 周辺の分子構造は、各部位共にシステインを中心に前後 3 個のアミノ酸を加えたアミノ酸長、計 7 個のペプチドについて HOMO を上記方法で計算した。各ペプチドのアミノ酸構造は次のようであった。

C151 周辺;—Gly-Glu-Lys-Cys-Val-Leu-His—、C273 周辺;—Ala-Val-Arg-Cys-His-Ser-Lue—、C288 周辺;—Leu-Gln-Lys-Cys-Glu-Ile-Leu—

同時に、各ペプチド共に最安定化構造の周辺 3~4 個の構造について HOMO の分布位置を調べた。

研究結果

1) アブラナ科野菜類イソチオシアネート化合物の LUMO 計算結果とその分子内分布位置

表-1 アブラナ科野菜のイソチオシアネート化合物と電子軌道計算結果(LUMO)

イソチオシアネート化合物	LUMO	野菜類	軌道位置
パラヒドロキシベンジル イソチオシアネート	-0.244eV	白マスタード	全てイソチオシアネート基 に存在
アリルイソチオシアネート	-0.212	黒マスタード	
フェネチルイソチオシアネート	-0.194	キャベツ、クレソン	
インドールイソチオシアネート	-0.194	キャベツ、ブロッコリー	
スルフォラファン	-0.161	ブロッコリースプラウト	
6-メチルスルフィニルヘキシル イソチオシアネート	-0.154	ワサビ	

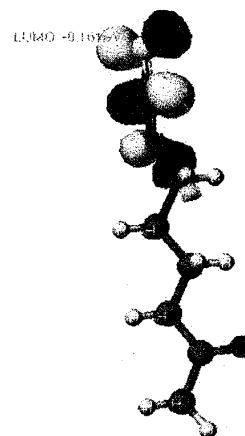


図-1 スルフォラファン LUMO

2) C151、C273、C288 周辺ペプチドの HOMO 計算結果とその分子内分布位置

表 2 オリゴペプチドの電子軌道計算結果(HOMO)

部位	安定構造型	計算結果	電子軌道位置
C151部位	HOMO-0	-6.338eV	E149の側鎖COOH
	同 -1	-6.593	同上
	同 -2	-6.922	同上
	同 -3	-8.912	C151の側鎖SH
C273部位	HOMO-0	-10.338	H274の側鎖5員環
	同 -1	-10.537	C273の側鎖SH
	同 -2	-11.443	H274の主鎖CO
C288部位	HOMO-0	-10.654	C288の側鎖SH
	同 -1	-11.644	L285の主鎖CO
	同 -2	-11.687	Q286の側鎖NH ₂
	同 -3	-11.711	I289を挟むCONH

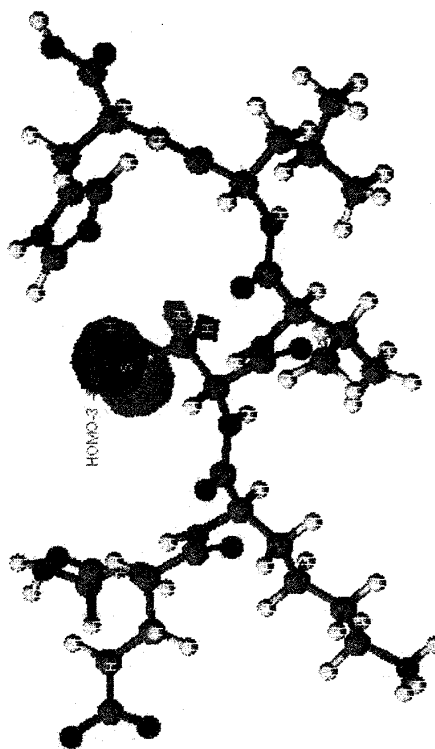


図-2 C151 HOMO-3

考察

代表的なアブラナ科野菜に含まれるイソチオシアレート化合物とそれらの LUMO およびこの電子軌道の分子内分布位置は表-1 のようであった。該化合物の構造は直鎖アルカンのものから芳香族のものまで顕著な違いがあるが、それらの LUMO は -0.244 から -0.154eV で比較的限られた範囲内の値であった。また、親電子性軌道の分子内分布位置も全てイソチオシアレート基の S 原子を中心に該基内に存在した。表-2 に記されている Keap 1 蛋白質ペプチドの電子供与性軌道の値に対照して各化合物は共に比較的画一的な反応を行うのではないかと考察される。次に C151, C273, C288 周辺のオリゴペプチドの電子供与性軌道の HOMO であるが、C151 部位のものでは HOMO-3 状態で -8.912eV であり、この状態でその分子内分布位置はシステインの S 分子に来る。HOMO-0 から HOMO-2 までの値は理論的にはより安定な構造状態の存在を示すと考えられるが、C151 部位ではチオアシルゲートを形成すると実証した先行研究¹⁰の結果と照らし合わせれば、HOMO-3 の状態に若干歪んだ構造を採っているとするのが妥当と考察される。C273 部位では、最安定化状態で H274 の側鎖 5 員環に軌道分布する構造が存在する可能性があるが、微妙な数値差で C273 の NCS 基上に分布する構造も存在し、それらの HOMO は -10.338 から -10.537eV の範囲のものである。また、C288 部位では HOMO の状態で -10.654eV で、この時にその軌道位置は C288 の NCS 基の上となる。これら三部位の HOMO の値を比較すると、立体障害要因を無視すればこれら三個のシステインの中で

は C151 が最も反応性が高いと考察される。興味深いことは、イソシアネート化合物の LUMO に比してこれらシステイン周辺部位の HOMO が相当に大きいことである。この意味することについては更に考察したいと考えている。さらに興味深いことは、表-2 の結果にも示されているように、各システイン部位では微妙な構造変化で電子供与性軌道の分子内位置が変動すると考えられることである。例えば、C151 部位では HOMO-0 から HOMO-2 までは E149 の側差の COOH 上に該軌道が分布するが、同一-3 では C151 上に位置する。C273 部位では表-2 のような結果であり、HOMO-2 では H274 の主鎖のペプチドに位置する。また、C288 部位でも構造変化により分布移動が起こると考えられる。このことは、これら分子の基本的な性質を示すと共に、モデル検討を行なう上での留意事項をも示し、同時に、順序立った複数個の軌道検討を行うことは分子の機能と構造の正しい関係を把握する確率を高めることでもあるので、本法のような検討法は食品類の機能と構造の簡便な一評価法と思われ更に検討を重ねたいと考えている。

参考文献

1. Block, G., et. al., *Nutr. Cancer* **18**, 1-29 (1992)
2. Ramos-Gones, M., et. al., *PNAS*, **98**, 3410-3415 (2001)
3. Itoh, K., et. al., *Genes Dev.*, **13**, 76-86 (1999)
4. Itoh, K., et. al., *Genes Cells*, **8**, 379-391 (2003)
5. Dinkova-Kostova, A. T., et. al., *PNAS*, **99**, 11908-11913 (2002)
6. Zhang, D. D., et. al., *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8137-8151 (2003)
7. Itoh, K., et. al., *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 36-45 (2004)
8. Xuchu, L., et. al., *J. Biol. Chem.*, **279**, 54750-54758 (2004)
9. Hong, F., et. al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 31768-31775 (2005)
10. Zhang, D. D., et. al., *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10941-10953 (2004)
11. Zhang, D. D., et. al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 30091-30099 (2005)
12. Hong, F., et. al., *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1917-1926 (2005)
13. Egger, A. L., *PNAS*, **102**, 10070-10075 (2005)

謝辞 本研究を実施するに当りご指導を賜りました人間総合科学大学教授 小林修平先生、(財)長寿科学研究振興財団顧問 大谷藤郎先生に厚くお礼を申し上げます。

(平成19年4月4日受理)